

## ВИВЧЕННЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ДЖЕРЕЛ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

*Основу кровотворення становлять поліпотентні стовбурові клітини. Крдова кров вважається одним з перспективних джерел стовбурових клітин для трансплантації. Втім одні наукові розробки свідчать про ідентичність проліферативного потенціалу і здатність до експансії кровотворних територій кісткового мозку і кордової крові, інші — про більші потенції клітин-попередників з кордової крові. Результати наукових досліджень, проведених нами у довготривалій культурі in vivo, показали більшу колонієформуючу активність кордової крові у порівнянні з кістковим мозком, що може бути пов'язаним із гетерогенністю стовбурових клітин.*

*Ключові слова: гемопоетична стовбурова клітина, кордова кров, кістковий мозок.*

Джерелами поліпотентних стовбурових клітин (ПСК) є кістковий мозок (КМ), мобілізована цитокінами периферична кров (ПК), кордова кров (КК) та ембріональні тканини [1]. Нещодавно отримано несподівані дані про існування нервових, епітеліальних, ендотеліальних стовбурових клітин, тобто соматичних стовбурових клітин (ССК) [2]. Висуваються гіпотези про пластичність стовбурових клітин, можливість ССК до трансдиференціації. Роботи на цю тему дуже привабливі в першу чергу завдяки тому, що стовбурові клітини з перелічених джерел можуть бути використані для трансплантації при різних захворюваннях, зокрема вроджених порушеннях імунної системи, спадкових анеміях, деяких хворобах обміну речовин та злоякісних гематологічних захворюваннях [3,4].

Найбажанішою альтернативою КМ, як класичному об'єкту для трансплантації, є ембріональні клітини. Вони приваблюють не тільки меншою антигенною залежністю у порівнянні з КМ донора, а й значно більшим проліферативним потенціалом. На жаль, цих клітин недостатньо для повноцінної трансплантації дорослій людині. Більше того, існують значні правові та етичні обмеження щодо використання ембріональних тканин [5]. ПК також містить гемопоетичні стовбурові клітини. Хоча вміст їх у ПК досить низький, інтенсивна обробка відповідними ростови-

ми факторами мобілізує їх у ПК з КМ. Однак при алотрансплантації таких клітин виникають проблеми, пов'язані з сумісністю донора та реципієнта [6].

На сьогоднішній день КК вважається найперспективнішим об'єктом для трансплантації завдяки порівняно легкій доступності, безпечності для донора, низькій ураженості вірусами та низькій імуногенності. Таким чином, методи для експансії кровотворних СК з КК викликають особливий інтерес як для клінічного застосування, так і для наукових досліджень [7, 8, 9]. Здатність стовбурових клітин підтримувати кровотворення шляхом їх постійної проліферації та диференціювання є вирішальною при трансплантації, тому загальноприйнято, що трансплантат повинен містити ранні гемопоетичні клітини-попередники, здатні відновити гемопоез. Але потенціал експансії, тривалість, з якою СК КК можуть репопулювати в організмі реципієнта, залишається до кінця невідомим. Дослідження проліферації і диференціювання є вирішальним при трансплантації, тому загальноприйнято, що трансплантат повинен містити ранні гемопоетичні клітини-попередники, здатні відновити гемопоез. Але потенціал експансії, тривалість, з якою СК КК можуть репопулювати в організмі реципієнта, залишаються до кінця невідомими. Дослідження проліферації і диференціювання кро-

вотворних клітин у довготривалій культурі клітин, отриманих з різних джерел, і аналіз функціональної активності СК протягом визначеного періоду через рівні проміжки часу в культурі вважаються адекватними підходами для оцінки потенційних можливостей кровотворних клітин до самовідновлення.

Метою роботи було дати оцінку морфофункціональним характеристикам кровотворних клітин КМ і КК у порівняльному аспекті шляхом довготривалого культивування їх *in vivo* для визначення потенційних можливостей СК з обох джерел відновлювати гемопоєз у разі трансплантації.

У роботі використовували культуральні, цитологічні та статистичні методи.

Матеріалом для експериментальних досліджень були КМ з фрагментів ребер, отриманих під час операції торахтомії, та КК, отримана під час пологів. Експерименти проводили на мишах лінії СВА вагою 18-20 г, віком 3-4 місяці. Експерименти склалися з двох етапів і проводилися в культурі *in vivo*.

Метою першого етапу було одержання довготривалої суспензійної культури мононуклеарів, виділених з КМ і КК. На цьому етапі у внутрішню порожнину дифузійних камер вводили  $1 \times 10^5$  клітин (фракцію мононуклеарів) КМ чи КК відповідно у живильному середовищі RPMI (Sigma) з фетальною телячою сироваткою (Gibco) та антибіотиками (Sigma).

За добу до експерименту мишей обробляли цитостатиком циклофосфамідом у концентрації, яка відповідає сублетальній дозі опромінення 500 R, для пригнічення імунологічної реактивності організмів мишей і стимуляції колонієтворення.

На другому етапі роботи через рівні проміжки часу (1 раз на тиждень) клітини з довготривалих культур після підрахунку й оцінки їх життєздатності переносили в живильне середовище RPMI (Sigma) з напіврідким агаром (Difco) у концентрації  $1 \times 10^5$  клітин/мл. Оцінка потенціалу експансії проводилась на основі обліку колонієтворних одиниць на 13-ту добу після імплантації

дифузійних камер з напіврідким агаром в черевну порожнину мишей з двох груп. До першої групи належали миші, у черевну порожнину яких імплантували камери з клітинами, перенесеними з суспензійних культур КМ, до другої - миші, яким імплантували камери з клітинами, перенесеними з суспензійних культур КК.

Вилучали по дві камери з кожної миші і під інвертованим мікроскопом лічили кількість колоній-клонів. Колонією вважалися клітинні агрегати з 40 і більше клітин.

Результати аналізу колонієтворення клітин-попередників показали, що, незважаючи на те, що ефективність клонування кровотворних клітин-попередників, виділених з довготривалих суспензійних культур КК і КМ, протягом перших двох тижнів культивування дорівнювала, відповідно,  $47,0 \pm 1,8$  і  $46,0 \pm 2,3$  на їх  $10^5$  експлантованих клітин, при подальшому культивуванні виявилась розбіжність у кількості клітин-попередників КК у порівнянні з КМ ( $45,3 \pm 1,7$  і  $36,5 \pm 2,5$  відповідно). Різниця статистично вірогідна. Крім того, клітинний склад колоній-клонів, виділених з культур КК, відрізнявся від культур КМ наявністю у клонах більшої кількості проліферуючих кровотворних елементів (бластних клітин, промієлоцитів, мієлоцитів і метамієлоцитів), які в першому випадку перевищували 60 %, а в другому - становили 20 %. Це свідчить про більший проліферативний потенціал стовбурових клітин з КК у порівнянні з КМ, що, очевидно, пов'язано з гетерогенністю їх найближчих нащадків і, внаслідок цього, викликає різницю у репопулюючій здатності.

Проаналізувавши характер росту кровотворних клітин кісткового мозку і кордової крові в довготривалих культурах у порівняльному аспекті та оцінивши їх функціональну активність, ми пересвідчилися у більших потенціях клітин кордової крові до довготривалого культивування, що є підставою стверджувати про більшу здатність стовбурових клітин кордової крові відновити гемопоєз у разі трансплантації.

1. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood / S. Huang, P. Law, D. Young, A. D. Ho II Exp Hematol.- 1998.- Vol. 12.-P. 1162-1171.
2. Stem Cell Plasticity in muscle and bone marrow I M. A. Goodell, K. A. Jackson, S. M. Majka, T. Mi II Annals of the New York Academy of Sciences.- 2001.- № 938.- P. 208-220.
3. An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures I G. Kogler, J. Callejas, R. V. Sorg, P. Wernet II Bone Marrow Transplant.- 1998.- Suppl. 3.- P. 48-53.
4. CD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup> cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors IE. A. de Wynter, D. Buck, C. Hart, e. a. II Stem Cells.- 1998.- V. 16, № 6.- P. 387-396.
5. Wobus I Potential of embryonic stem cells II Molecular aspects of medicine.- 2001.- V. 22.- P. 149-164.
6. Wang J. C. Y, Doedens M., Dick J. E. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay II Blood.- 1997.- V. 11.-P. 3919-3924.
7. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells I H. E. Broxmeyer, G. W. Gordon, G. Hangos et al. II Proc. Natl. Acad. Sci USA.- 1989.- V. 86.- P. 3828-3837.

8. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации / С. В. Юрасов, Е. Б. Владимирская, А. Г. Румянцев, С. Мур // Гематология и трансфузиология.- 1997.- № 2.- С 10-15.

9. Морфологическая характеристика и функциональные особенности клеток кордовой крови / Г. И. Козут, Г. Т. Глухенькая, А. П. Гацук и др. // Гематологія і переливання крові. Міжвідомчий збірник.- К.: Нора-прінт, 1998- С 191-196.

*N. Bilko, O. Dowshenko, D. Bilko*

## STUDING THE ALTERNATIVE SOURCES OF THE STEM CELLS FOR THE TRANSPLANTATION

*The hematopoietic stem cells (HSC) are the base of blood forming. Cord blood is considered as the one of the perspective source of HSC for transplantation. However scientific data show that its proliferation and expansion potentials are equal, or even higher to those in BM. We demonstrated that CB possesses the higher level of progenitor cells proliferating capacity in long-term culture than BM. We relay these results with the heterogeneity of the progeny of stem cells.*

*Key words: hematopoietic stem cell, cord blood, bone marrow.*